

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 35/14, 38/18 // (A61K 38/18, 35:14)		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/24044
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	20. Mai 1999 (20.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT98/00278		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. November 1998 (12.11.98)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(30) Prioritätsdaten: A 1916/97 12. November 1997 (12.11.97) AT			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-PRODUCTS & BIO-ENGINEERING AKTIENGESSELLSCHAFT [AT/AT]; Schottenring 10, A-1010 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUN, Friedrich [AT/AT]; Gloriettegasse 2, A-1130 Wien (AT). SPÄGLER, Hans-Peter [AT/AT]; Währingerstrasse 93, A-1180 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermak-Gasse 2, A-1180 Wien (AT).			
(74) Anwälte: SCHWARZ, Albin usw.; Wipplingerstrasse 32/22, A-1010 Wien (AT).			
(54) Title: MEDICINE FOR PROMOTING CICATRIZATION AND CONTAINING THROMBOCYTES			
(54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL ZUR FÖRDERUNG DER WUNDHEILUNG ENTHALTEND THROMBOZYTEN			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns a medicine for promoting cicatrization designed for local application. Said medicine contains thrombocytes or thrombocyte fragments comprising growth factors capable of being discharged and which are present in freeze-dried or frozen state and subjected to a process for reducing the number of viruses and/or for inactivating viruses.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur lokalen Anwendung für die Förderung der Wundheilung, welches Thrombozyten oder Teile von Thrombozyten aufweist, wobei diese Wachstumsfaktoren enthalten und diese abgeben können, in lyophilisiertem oder tiefgefrorenem Zustand vorliegen, und einem Verfahren zur Virusanreicherung und/oder Virusinaktivierung unterzogen sind.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

ARZNEIMITTEL ZUR FÖRDERUNG DER WUNDHEILUNG ENTHALTEND THROMBOZYTEN

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur lokalen Anwendung für die Förderung der Wundheilung.

Es ist bekannt, daß die Wundheilung in mehreren zeitlich aufeinanderfolgenden Stadien erfolgt.

Im Stadium I wird das Blutplasmaeiweiß Fibrinogen durch Thrombin gefällt, so daß es zur Bildung eines Fibrinclots kommt, der sich in Anwesenheit von Blutgerinnungsfaktor XIII verfestigt. Dieses erste Stadium dient der Blutstillung und Abdichtung der Wundfläche und erfolgt in Minuten.

Im Stadium II wandern in den Fibrinclot Zellen aus dem Wundareal, und zwar Entzündungszellen, Bindegewebszellen und Endothelzellen, ein. Sie bilden Gefäße und als extrazelluläre Matrix Bindegewebe, das vorwiegend aus Kollagen besteht. Dieses als Granulationsgewebe bezeichnete Bindegewebe dient als Unterlage für die Bildung von Epithelgewebe, an der Körperoberfläche ist es die Unterlage für die Epidermis. Stadium II dauert Tage bis Wochen und ist abgeschlossen, wenn das Wundareal durch Epithel, an der Haut durch die Epidermis, verschlossen ist.

Die Wundheilung wird durch das Stadium III, das Wochen bis Monate dauert, abgeschlossen. Im Laufe dieser Phase nehmen die zellulären Elemente ab und das Bindegewebe zu, so daß ein festes und dauerhaftes Narbengewebe entsteht. (Bennett N.T., Schultz G.S., Am. J. Surg. 1993, 165: 728-737; Bennett N.T., Schultz G.S., Am. J. Surg. 1993, 166: 74-81).

Die Bildung von Granulationsgewebe im Stadium II des Wundheilungsprozesses wird durch Wachstumsfaktoren bewirkt, welche die Migration und die Teilung von Bindegewebszellen sowie die Neubildung von Gefäßen fördern und auf diese Weise die Wundheilung vorantreiben. Von den bekannten Wachstumsfaktoren sind insbesondere der Platelet derived growth factor (PDGF), der Transforming growth factor β (TGF- β), der Epidermal growth factor (EGF) und der Insulin-like growth factor I (IGF-I) an diesen Vorgängen beteiligt. (Bennett N.T., Schultz G.S., Am. J. Surg. 1993, 165: 728-737; Bennett N.T., Schultz G.S., Am. J. Surg. 1993, 166: 74-81; Bhora F.Y. et al., J. Surg. Res. 1995, 59: 236-244; Lynch S.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84: 640-646; Lynch S.E. et al., J. Clin. Invest. 1989, 84: 7696-7700).

Auch die Neubildung der Epidermis wird durch Wachstumsfaktoren bewirkt. Sie aktivieren die Epidermiszellen (Keratinozyten), die durch die Verletzung aus dem Zellverband der intakten Basalzellschicht herausgelöst wurden, so daß sie spezifische Membranrezeptoren ausbilden, welche die Anhaftung an die Granulationsgewebsunterlage, besonders an Fibrin-Fibronektin ermöglichen, das ein provisorisches Gerüst für die Migration der Keratinozyten darstellt. (Brown G.L. et al., J. Exp. Med. 1986, 163: 1319-1324; Brown G.L. et al., N. Engl. J. Med. 1989, 321: 76-79).

Wachstumsfaktoren werden im menschlichen Körper von verschiedenen Geweben bzw. Zellarten synthetisiert und in die umgebende Körperflüssigkeit sezerniert. Im Rahmen der Wundheilung kommt den Thrombozyten, welche die für die Wundheilung wesentlichen Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β , EGF und IGF-I in signifikanten Mengen synthetisieren und in zytoplasmatischen Granula speichern können, eine wichtige regulatorische Rolle zu. (Lynch S.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987; 84: 640-646; Ginsberg M.H. et al., Thromb. Haemostas. 1988, 59: 1-6; Hyner O.R., Thromb. Haemostas. 1991, 66: 40-43).

Zur Freisetzung bzw. Abgabe der gespeicherten Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten müssen diese durch physiologische Stimuli, wie z.B. Kollagen, Thrombin, Trypsin, ADP, Serotonin oder Adrenalin, welche an spezifische Rezeptoren an der äußeren Oberfläche der Thrombozyten-Plasmamembran binden, aktiviert werden. Die Aktivierung führt zu einer Formänderung mit nachfolgender Aggregation der Thrombozyten, worauf diese die gespeicherten Wachstumsfaktoren in die umgebende Körperflüssigkeit sezernieren. Bei den meisten dieser physiologischen Stimuli ist die der Aktivierung folgende Aggregation der Thrombozyten eine Voraussetzung für die Freisetzung der Wachstumsfaktoren. Bei Stimulation mit Thrombin können die Wachstumsfaktoren auch ohne Thrombozytenaggregation freigesetzt werden. (Kaplan K.L. et al., Blood 1979, 53: 604-618; Holmsen H. et al., J. Biol. Chem. 1981, 256: 9393-9396; Philipps D.R., Baughan A.K., J. Biol. Chem. 1983, 258: 10240-10245).

Die zur Aggregation führenden Wechselwirkungen zwischen den aktivierten Thrombozyten und deren Anheftung an Oberflächen werden durch extrazelluläre adhäsive Matrixproteine, wie z.B. Fibrinogen, Fibronektin und Von-Willebrand-Faktor, vermittelt, die an einen Glykoproteinrezeptor an der Außenseite der Plasmamembran der aktivierten Thrombozyten binden. Eine starke Bindung dieser Matrixproteine an den Rezeptor erfolgt nur, wenn die Thrombozyten wie oben beschrieben durch einen geeigneten Stimulus aktiviert worden sind. Diese komplexen Abläufe von Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten mit nachfolgender Freisetzung von Wachstumsfaktoren bilden eines der wesentlichen

Steuerungselemente im Wundheilungsprozeß. (Ginsberg M.H. et al., *Thromb. Haemostas.* 1988, 59: 1-6; Hyner O.R., *Thromb. Haemostas.* 1991, 66: 40-43; Landolfi R. et al., *Blood* 1991, 78: 377-381; Perschke E.I. et al., *Blood* 1980, 55: 841-847; Hynes O.R., *Cell* 1992, 69: 11-25; Perschke E.I., *J. Lab. Clin. Med.* 1994, 124: 439-446; Savage B., Ruggeri Z.M., *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 11227-11233; Bennett J.S. et al., *J. Biol. Chem.* 1982, 257: 8049-8054; Cierniewski C.S. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 714: 543-548; Philipps D.R., Baughan A.K., *J. Biol. Chem.* 1983, 258: 10240-10245).

Störungen der Wundheilung, wie sie etwa bei der Zuckerkrankheit, bei venösen oder arteriellen Verschußkrankheiten vorkommen, aber auch Wundheilungsstörungen anderer Genese, wie etwa Bestrahlung mit radioaktiven Substanzen oder nach Verbrennungen, betreffen insbesondere das Stadium II des Wundheilungsprozesses. Dabei konnte festgestellt werden, daß in diesen Fällen die Wachstumsfaktoren in einem vermindertem Ausmaß vorhanden sind, sodaß kein oder nur minderwertiges Granulationsgewebe gebildet wird. (Dvovich V.M. et al., *Surgery* 1992, 112: 18-23; Matsuoka J., Grotendorst G.R., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1989, 86: 4416-4420).

Um bei Wundheilungsstörungen die Wundheilung zu verbessern, ist es bekannt, Wachstumsfaktoren einzeln oder in Kombination als Reinsubstanz oder in Salbengrundlagen gemischt auf das Wundareal aufzubringen (Knighton D.R. et al., *Surg. Gynecol. Obstet.* 1990, 170: 56-60; Brown G.L. et al., *J. Exp. Med.* 1986, 163: 1319-1324; Holmsen H. et al., *J. Biol. Chem.* 1981, 256: 9393-9396). Die so zugeführten Wachstumsfaktoren werden jedoch rasch inaktiviert bzw. abgebaut und entfalten ihre Wirkung nur über eine kurze Zeitspanne (Minuten) nach der Applikation, wodurch mit diesen Präparationen keine zufriedenstellende Verbesserung der Wundheilung erzielt werden.

Andere bekannte Therapieansätze bestehen darin, das Wundareal mit Kollagenschwämmen bzw. anderen Präparationen zu bedecken, die eine ständige Feuchtigkeit des Wundareals gewährleisten sollen oder Präparationen zu verwenden, welche die oberflächliche Bindegewebsschicht des Wundareals fermentativ abbauen, sodaß neues Bindegewebe vom Wundgrund aus nachwachsen kann (Nielsen P.G. et al., *Acta Dermato-Venerologica* 1990, Suppl. 152: 1-12; Lippert P., Wolff H., *Zent.bl. Chir.* 1990, 115: 1175-1180). Alle diese bisher angewendeten Wundverbände bzw. Präparationen oder Arzneimittel führen jedoch zu keinem zufriedenstellenden Erfolg bei der Verbesserung der Wundheilung.

Die vorliegende Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, ein Arzneimittel zur Verfügung zu stellen, welches die natürlichen Wundheilungsvorgänge wirksam beschleunigt und die Wundheilung bei Vorliegen von Wundheilungsstörungen, insbesondere auch bei schweren

Formen, im Vergleich zu den bisher bekannten Mitteln und Maßnahmen deutlich verbessern kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Arzneimittel zur lokalen Anwendung für die Förderung der Wundheilung bereitgestellt wird, welches Thrombozyten oder Teile von Thrombozyten aufweist, wobei diese Wachstumsfaktoren enthalten und diese abgeben können und in lyophilisiertem oder tiefgefrorenem Zustand vorliegen und einem Verfahren zur Virusabreicherung und/oder Virusinaktivierung unterzogen sind.

Unter "Teile von Thrombozyten" sind alle unlöslichen Thrombozytenbestandteile zu verstehen, die entweder durch Filtration, einschließlich Nanofiltration, oder durch Zentrifugation, einschließlich Ultrazentrifugation, von den löslichen Thrombozytenbestandteilen abtrennbar sind.

Im folgenden bezeichnet - wenn nicht anders angegeben - der Begriff "Thrombozyten" auch "Teile von Thrombozyten".

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die lokale Anwendung von Thrombozyten, welche Wachstumsfaktoren enthalten und diese abgeben können, die Wundheilungsvorgänge wirksam beschleunigen kann. Die auf das Wundareal aufgebrachten Thrombozyten stellen ein natürliches Reservoir für die zur Förderung der Wundheilungsprozesse benötigten Wachstumsfaktoren dar. Es hat sich gezeigt, daß die Aktivierung der lokal applizierten Thrombozyten durch im Wundareal vorhandene physiologische Stimuli mit nachfolgender Aggregation und Bindung der im Wundareal vorhandenen Matrixproteine dazu führt, daß die in den Thrombozyten gespeicherten Wachstumsfaktoren kontinuierlich über einen längeren Zeitraum (mehrere Tage) in das Wundareal abgegeben werden. Dadurch stehen offenbar höhere Konzentrationen an Wachstumsfaktoren über einen wesentlich längeren Zeitraum als bei direkter Gabe der Wachstumsfaktoren im Wundareal zur Verfügung, wodurch das Einwandern von Entzündungszellen, Bindegewebszellen und Endothelzellen gefördert und die Vermehrung dieser Zellen im Stadium II des Wundheilungsprozesses gesteigert wird. Auf diese Weise kommt es zu einer raschen und ausreichenden Bildung von Granulationsgewebe, was wiederum die Ausbildung von Epithelgewebe und den endgültigen Wundverschluß ermöglicht. Der Epithelisierungsvorgang wird außerdem durch die freigesetzten Wachstumsfaktoren, welche die Einwanderung und Vermehrung von Epithelzellen fördern, zusätzlich beschleunigt.

Um die Haltbarkeit des Arzneimittels über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, liegen die Thrombozyten im erfindungsgemäßen Arzneimittel vorzugsweise in lyophilisiertem oder

tiefigefrorenem Zustand vor. Zur Minimierung des Risikos von Virusinfektionen werden die Thrombozyten vorteilhaft einem Verfahren zur Virusabreicherung und/oder Virusinaktivierung unterzogen, wobei ein physikalisches oder chemisches Verfahren oder ein Kombinationsverfahren angewendet werden kann.

Zur Bereitstellung einer höheren Konzentration an Wachstumsfaktoren, insbesondere in der Behandlung von Wundheilungsstörungen, ist es bevorzugt, daß der Gehalt an Thrombozyten oder an Teilen von Thrombozyten des erfindungsgemäßen Arzneimittels derart ist, daß er nach Rekonstitution des Lyophilisates bzw. nach Auftauen mindestens 10^4 , vorzugsweise mindestens 10^5 , Thrombozyten pro μl entspricht.

Um eine besonders ausgeprägte Initialwirkung des erfindungsgemäßen Arzneimittels unmittelbar nach Applikation zu erzielen, kann es, insbesondere bei schweren Wundheilungsstörungen, sinnvoll sein, daß das Arzneimittel weitere Wachstumsfaktoren aufweist, welche nicht aus den im Arzneimittel enthaltenen Thrombozyten stammen. Die weiteren Wachstumsfaktoren können vom selben Typ sein wie die von den Thrombozyten des erfindungsgemäßen Arzneimittels gespeicherten und abgegebenen Wachstumsfaktoren oder einem unterschiedlichen Typ angehören. Die Wachstumsfaktoren können mit den Thrombozyten im gleichen Behältnis vorliegen oder als Lösung oder Lyophilisat in einem separaten Behältnis enthalten sein.

Es hat sich gezeigt, daß es insbesondere bei ausgeprägten Fällen von Wundheilungsstörungen vorteilhaft ist, wenn das Arzneimittel Biomaterialien aufweist. Unter Biomaterialien im Sinne der Erfindung sind alle Materialien zu verstehen, welche gewebeverträglich und resorbierbar sind und im Zusammenwirken mit den im Arzneimittel enthaltenen Thrombozyten oder Wachstumsfaktoren oder unabhängig davon die Förderung der Wundheilung unterstützen. So können beispielsweise Substanzen, welche als Stimuli Thrombozyten aktivieren, und/oder Materialien, welche die Aggregation von Thrombozyten vermitteln, als Biomaterialien im erfindungsgemäßen Arzneimittel enthalten sein. Auf diese Weise wird die Wirkung der natürlichen, im Wundareal vorhandenen aktivierenden und aggregationsvermittelnden Substanzen verstärkt, wodurch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren erhöht und die Wundheilung noch stärker gefördert werden.

Zur Minimierung des Risikos von Virusinfektionen werden die Biomaterialien vorzugsweise einem Verfahren zur Virusabreicherung und/oder Virusinaktivierung unterzogen, wobei ein physikalisches oder chemisches Verfahren oder ein Kombinationsverfahren angewendet werden kann. Die Biomaterialien können einem solchen Verfahren einzeln oder im Gemisch mit anderen Bestandteilen des Arzneimittels (z.B. Thrombozyten) unterworfen werden.

Um die Haltbarkeit des Arzneimittels über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, liegen die Biomaterialien im erfindungsgemäßen Arzneimittel vorteilhaft in lyophilisiertem oder tiefgefrorenem Zustand vor. Dabei können die Biomaterialien mit den Thrombozyten und/oder Wachstumsfaktoren in gemeinsamen Behältnissen vorliegen oder in getrennten Behältnissen enthalten sein und das Tiefrieren bzw Lyophilisieren der Biomaterialien an diesen einzeln oder im Gemisch mit anderen Bestandteilen des Arzneimittels vorgenommen werden.

Es ist bekannt, daß die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten und damit die Freisetzung von in den Thrombozyten gespeicherten Wachstumsfaktoren durch die Anlagerung von Matrixproteinen ermöglicht wird. Außerdem können solche Proteine vernetzte Strukturen ausbilden, an denen die Thrombozyten anhaften und sich mit dem Wundareal fest verbinden, wobei diese Strukturen die Diffusion der Wachstumsfaktoren zum Wundareal und das Einwandern der Zellen aus dem Wundareal fördern. Demgemäß ist eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Arzneimittels dadurch gekennzeichnet, daß als Biomaterialien Gewebeklebstoff und/oder Kollagen vorgesehen sind. Unter Gewebeklebstoff im Sinne der Erfindung werden Biomaterialien verstanden, die ganz oder teilweise aus vernetzbaren Proteinen bestehen, welche zur Gewebeklebung geeignet sind.

Fibrinogen ist eine besonders wirksame Substanz zur Auslösung der Aggregation aktivierter Thrombozyten, während Thrombin eine der wirksamsten Substanzen für die Aktivierung von Thrombozyten darstellt. Es ist daher vorteilhaft für die Steigerung der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und die Verbesserung der Wundheilung, daß der Gewebeklebstoff aus fibrinogenhaltigen Proteinen und Thrombin zusammengesetzt ist.

Es hat sich gezeigt, daß humane Zellen, wie Keratinozyten, Epithelzellen, embryonale und fetale Zellen, sowie Zellbestandteile, wie Liposomen, die durch Thrombozyten geförderte Wundheilung und Zellvermehrung noch zusätzlich beschleunigen können. Es ist daher bevorzugt, daß das Arzneimittel zusätzlich Epithelzellen und/oder Keratinozyten und/oder embryonale und/oder fetale Zellen und/oder Liposomen aufweist. Die Zellen bzw. Liposomen können als flüssige oder tiefgefrorene Suspension oder als Lyophilisat in getrennten Behältnissen oder eine oder mehrere der genannten Zellarten oder Liposomen entweder ohne oder mit einem der anderen Bestandteile des Arzneimittels in gemeinsamen Behältnissen vorliegen.

Zur Minimierung des Risikos von Virusinfektionen können die Zellen bzw. Liposomen einem Verfahren zur Virusabreicherung und/oder Virusinaktivierung unterzogen sein, wobei ein

physikalisches oder chemisches Verfahren oder ein Kombinationsverfahren angewendet werden kann. Die Zellen bzw. Liposomen können einem solchen Verfahren einzeln oder im Gemisch mit anderen Bestandteilen des Arzneimittels unterworfen werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Thrombozyten oder Teilen von Thrombozyten, welche Wachstumsfaktoren enthalten, zur Herstellung eines Arzneimittels zur lokalen Anwendung für die Förderung der Wundheilung.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung werden im folgenden anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels

Humanes Thrombozytenkonzentrat oder Konzentrat aus Thrombozytenbestandteilen wird durch 3% Natriumcitrat antikoaguliert und zentrifugiert (1000 g/ 20 min), um Plasma und andere Zellbestandteile zu entfernen. Der thrombozytenreiche Überstand bzw. der Überstand an Thrombozytenbestandteilen wird in RPMI-Medium suspendiert und dreimal in RPMI-Medium (1000 g/ 20 min) gewaschen. Die gewaschenen Thrombozyten bzw. die gewaschenen Thrombozytenbestandteile werden in einem RPMI-Medium suspendiert und auf eine Konzentration von mindestens 6×10^5 Thrombozyten bzw Thrombozytenbestandteilen pro μ l eingestellt. Die Thrombozytensuspension wird sodann einem Virusinaktivierungsverfahren gemäß Beispiel 3 unterzogen und anschließend entsprechend den unten beschriebenen Verfahren tiefgefroren oder lyophilisiert, wodurch ein erfindungsgemäßes Arzneimittel erhalten wird.

Tieffrierung: Je 1 ml der Thrombozytensuspension wird bei -80°C innerhalb von 30-40 Minuten schock-tiefgefroren und tiefgefroren gelagert. Vor Verwendung wird das Thrombozytenkonzentrat bei Zimmertemperatur aufgetaut.

Lyophilisierung: Je 1 ml der Thrombozytensuspension wird bei -80° für mindestens 24 Stunden tiefgefroren und anschließend bei -20°C bis -40°C über 20 bis 24 Stunden unter Vakuum gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Thrombozyten werden zwischen -20°C und -80°C gelagert und vor Verwendung mit 1 ml RPMI-Medium rehydriert.

Beispiel 2: Herstellung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels, das Biomaterialien aufweist

Der gemäß Beispiel 1 hergestellten virusinaktivierten Thrombozytensuspension wird eine Lösung von vernetzbarem humanen Eiweiß (entweder Fibrinogen, Fibronectin, Blutgerinnungsfaktor XIII oder Kollagen), das einem oder mehreren Verfahren zur Virusinaktivierung gemäß Beispiel 4 unterzogen worden sein kann, zugesetzt und zwar jeder Eiweißkörper einzeln oder miteinander in Kombination, wobei die Konzentration der vernetzbaren Eiweißkörper in der zugesetzten Lösung vorzugsweise 70-90 mg/ml betragen soll. Das Mischungsverhältnis von Thrombozytensuspension zur Lösung von vernetzbarem humanen Eiweiß soll vorzugsweise 1:3 betragen. Die so erhaltene Mischung wird zur Erzielung einer zweckmäßigen Haltbarkeit gemäß den in Beispiel 1 dargestellten Verfahren tiefgefroren oder lyophilisiert.

Anstelle der Durchführung der Virusinaktivierung an den Einzelkomponenten (Thrombozyten bzw. Biomaterialien) ist es auch möglich, die Virusinaktivierung an dem Gemisch von Thrombozytensuspension und Proteinlösung gemäß dem Verfahren von Beispiel 3 vorzunehmen.

Beispiel 3: Virusinaktivierung der Thrombozytensuspension (Photodynamische Virusinaktivierung)

Zu 50 ml der gemäß Beispiel 1 hergestellten Thrombozytensuspension wird 8-Methoxypsoralen (gelöst in Dimethylsulfoxid [DMSO]) bis zu einer Endkonzentration von 300 µg/ml (Endkonzentration von DMSO 0,3 %) zugesetzt und bei 22-27°C unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% N₂ und einem Druck von 2 psi 6 Stunden lang mit ultraviolettem Licht von unten und oben bestrahlt, sodaß die gesamte Lichtintensität 3,5 bis 4,8 mW/cm² beträgt (Lin L. et al., Blood 1989, 74: 517-525).

Nach durchgeführter Photoinaktivierung werden die so erhaltenen Thrombozytensuspensionen auf ihre funktionelle Kapazität untersucht. Die funktionelle Kapazität wird durch Messung des [³H]-Thymidineinbaus in einer Fibroblastenzellkultur bestimmt.

Beispiel 4: Virusinaktivierung der Biomaterialien (Chemische Virusinaktivierung)

Biomaterialien, die der gemäß Beispiel 1 hergestellten Thrombozytensuspension zugesetzt werden, werden durch die Solvent-Detergent-Methode virusinaktiviert. Dazu wird einer Suspension der Biomaterialien bei 30°C 1% (Gew./Gew.) Tri(n-butyl)phosphat und 1% (Gew./Gew.) Triton X-100 zugesetzt und das Gemisch 4 Stunden unter Schütteln belassen. Danach wird unter Zusatz von 5 % (Vol./Vol.) Sojabohnenöl die Solvent-Detergent-Mischung aus der Suspension der Biomaterialien an einer C18-Säule (Waters Millipore) durch Chromatographie entfernt (Horowitz B. et al., Blood 1992, 79: 826-831; Piet M.P.J. et al., Transfusion 1990, 30: 591-598; Piquet Y. et al., Vox sang. 1992, 63: 251-256).

Die mit der oben beschriebenen chemischen Virusinaktivierungsmethode behandelten Biomaterialien können nachfolgend zusätzlich noch einer photodynamischen Virusinaktivierung unterzogen werden.

Beispiel 5: Nachweis der Förderung der Bindegewebsvermehrung durch das erfindungsgemäße Arzneimittel

Der Test wurde an einer Fibroblastenzellkultur durchgeführt. Auf einer Zellkulturplatte wurde das gemäß Beispiel 2 hergestellte erfindungsgemäße Arzneimittel in einer Menge von 200 µl pro cm² aufgetragen und durch 50 µl einer Thrombinlösung (3,2 IU Thrombin pro ml physiologischer Kochsalzlösung) aktiviert. Auf die aufgetragene Suspension wurden humane Fibroblasten, die aus der 4. bis 10. Passage einer primären Kultur stammten, in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro cm² gesetzt und in einem Zellkulturmedium (RPMI) kultiviert (Kultur 1). Am dritten, fünften und siebenten Tag der Kultivierung wurde die Zell-Mitoserate durch Messung der DNA-Synthese über den Einbau von [³H]-Thymidin gemessen. Die Zell-Mitoserate von Kultur 1 wurde mit der Zell-Mitoserate einer anderen Fibroblastenkultur (Kultur 2) verglichen, die in einem RPMI-Nährmedium, dem 10 Vol% Kalbserum beigelegt worden waren, ohne Zusatz des erfindungsgemäßen Arzneimittels erfolgte.

Ergebnisse: Kultur 1 zeigte am Tag 3 der Kultivierung einen 7-fach höheren [³H]-Thymidineinbau (196645 ± 56864 cpm/ml) als Kultur 2. An den Tagen 5 (152749 ± 93951 cpm/ml) und 7 (77045 ± 27974 cpm/ml) war der [³H]-Thymidineinbau bei Kultur 1 immer

-10-

noch 5- bis 10-fach höher als bei Kultur 2. Diese Unterschiede zwischen Kultur 1 und Kultur 2 sind statistisch hochsignifikant ($p < 0,01$) und demonstrieren die Fähigkeit des erfindungsgemäßen Arzneimittels, die Bindegewebsvermehrung zu fördern und diese Aktivität über einen längeren Zeitraum (zumindest 7 Tage) aufrecht zu erhalten.

Beispiel 6: Nachweis, daß die Bindung von Matrixproteinen an den Thrombozytenoberflächen dazu führt, daß die in den Thrombozyten gespeicherten Wachstumsfaktoren kontinuierlich abgegeben werden.

Der Test wurde an einer Fibroblastenkultur (gemäß Beispiel 5) durchgeführt. In Kultur 1 war - wie in Beispiel 5 - das erfindungsgemäße Arzneimittel zugesetzt. In Kultur 2 wurden die Thrombozyten mit spezifischen Antikörpern gegen die oberflächlichen Bindungsstellen für Matrixproteine behandelt, so daß die Matrixproteine nicht an die Thrombozytenoberflächen binden konnten. Am dritten Tag der Kultivierung wurde die Zell-Mitoserate durch Messung der DNA-Synthese über den Einbau von [^3H]-Thymidin gemessen.

Ergebnisse: Während Kultur 1 eine Thymidineinbaurate ähnlich wie in Beispiel 5 aufwies, konnte in Kultur 2 kein Thymidineinbau gemessen werden. Dieser Unterschied beweist, daß für die Freisetzung der in den Thrombozyten gespeicherten Wachstumsfaktoren die Bindung von Matrixproteinen an der Thrombozytenoberfläche notwendig ist.

Beispiel 7: Nachweis der Förderung der Wundheilung durch das erfindungsgemäße Arzneimittel

Die klinische Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Arzneimittels wurde an 6 Patienten mit chronischen, nicht heilenden cutanen Ulcera der unteren Extremitäten, die bereits länger als ein halbes Jahr mit chirurgischer oder konservativ-lokaler Therapie erfolglos behandelt worden waren, geprüft. Die Ulcera wurden nach einem von Knighton D.R. et al., Ann. Surg. 1986, 204: 322-330, angegebenen Wundscore klassifiziert. Der Wundscore beinhaltet allgemeine Parameter, anatomische Bedingungen und Meßgrößen des Ulcus. Je höher die Punktezahl, desto schlechter die Voraussetzungen für die Heilung; es können 97 Punkte als Maximum (=schlechteste Ausgangssituation) erreicht werden.

Behandlungsplan:

Die Ulcera wurden gereinigt, nekrotisches Gewebe entfernt und mit Thrombinlösung (3,2 IU bovines Thrombin/ml RPMI-Medium) benetzt. Anschließend wurde der Defekt mit dem gemäß Beispiel 2 hergestellten, aufgetauten erfindungsgemäßen Arzneimittel aufgefüllt und darauf zur Aktivierung der Thrombozyten die oben genannte Thrombinlösung in einem Volumsverhältnis Arzneimittelsuspension zu Thrombinlösung von 3:1 aufgetragen. Die so versorgten Ulcera wurden mit einem nicht haftenden Wundverband (Metallfolie) bedeckt. Bis zur Abheilung wurden die Ulcera in oben angegebener Art zweimal pro Woche behandelt. Der Heilungsfortschritt wurde fotografisch und histologisch (Feinnadelbiopsien in der 2. und 5. Behandlungswoche) dokumentiert.

Ergebnisse:

Die Patientendaten, ursächliche Gefäß- und Stoffwechselerkrankungen sowie die Auswertung der Wundscores am Behandlungsbeginn sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Patient	Geschlecht	Alter	Gefäßerkrankung		Stoffwechsel- erkrankung	Wundscore
			arteriell	venös		
1	männlich	67	+	+	Diabetes	51
2	männlich	72	+	-	-	65
3	männlich	69	+	-	Diabetes	33
4	männlich	63	+	-	Diabetes	49
5	männlich	78	+	+	Diabetes	63
6	weiblich	74	-	+	-	65 ^a /63 ^b

^{a,b}) zwei Ulcera an einem Bein: ^a) proximales, ^b) distales Ulcus

Der zeitliche Ablauf der Wundheilung (angegeben in Wochen nach Behandlungsbeginn) ist in Tabelle 2 dargestellt.

-12-

Tabelle 2

Patient	Beginn der Granulationsgewebsbildung	Beginn der Epithelisierung	Abschluß der Epithelisierung
1	1. Woche	3. Woche	8. Woche
2	1. Woche	3. Woche	9. Woche
3	3. Woche	8. Woche	12. Woche
4	1. Woche	4. Woche	10. Woche
5	1. Woche	kein	kein
6	^{a,b} 1. Woche	^a 6./ ^b 3. Woche	^a 12./ ^b 9. Woche

^{a,b}) zwei Ulcera an einem Bein: ^a) proximales, ^b) distales Ulcus

Mit Ausnahme von Patient 3 bildete sich bei allen Patienten vom Ulcusboden her bereits in der ersten Behandlungswoche ein gut durchblutetes Granulationsgewebe aus, das nach weiteren Behandlungen mit dem erfindungsgemäßen Arzneimittel bis etwa zwei Wochen nach Therapiebeginn zunahm und das Ulcus ausfüllte. Auffallend war, daß sich bei allen Patienten bereits nach den ersten Behandlungen die Umgebung des Ulcus beruhigte, das Erythem und das Ödem der umliegenden Haut verschwanden und auch der Ulcusrand nicht mehr ödematös und mißfarben war. Histologisch zeigte sich bei allen Biopsien in der zweiten Behandlungswoche zellreiches, vorwiegend aus Fibroblasten und Fibrozyten bestehendes Granulationsgewebe mit reichlicher Gefäßneubildung und kollagener Faserbildung und mit nur oberflächlich geringer Infiltration von Entzündungszellen und Gewebnekrosen. Eine Epithelisierung der Hautdefekte ging nach der dritten Behandlungswoche von den Wundrändern aus und konnte dann auch histologisch bei den zweiten Biopsien in der fünften Behandlungswoche nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Behandlung nahm das Ausmaß der Ulcera einerseits durch die Epithelisierung, aber auch durch eine narbige Schrumpfung ab. Sie heilten mit Ausnahme bei Patient 5 spätestens in der 12. Behandlungswoche narbig ab.

Die oben angeführten Ergebnisse zeigen, daß die lokale Anwendung des erfindungsgemäßen Arzneimittels bei Patienten, die mit konservativer Therapie mindestens ein halbes Jahr lang erfolglos behandelt worden waren und daher extrem schlechte Voraussetzungen für eine

-13-

Wundheilung aufweisen, die Wundheilung fördern und auf diese Weise chronisch nichtheilende, cutane Ulcera zur Ausheilung bringen kann.

Patentansprüche:

1. Arzneimittel zur lokalen Anwendung für die Förderung der Wundheilung, welches Thrombozyten oder Teile von Thrombozyten aufweist, wobei diese
 - Wachstumsfaktoren enthalten und diese abgeben können,
 - in lyophilisiertem oder tiefgefrorenem Zustand vorliegen, und
 - einem Verfahren zur Virusabreicherung und/oder Virusinaktivierung unterzogen sind.
2. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt an Thrombozyten oder an Teilen von Thrombozyten derart ist, daß er nach Rekonstitution des Lyophilisates bzw. nach Auftauen mindestens 10^4 , vorzugsweise mindestens 10^5 , Thrombozyten pro ml entspricht.
3. Arzneimittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es weitere Wachstumsfaktoren aufweist.
4. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es Biomaterialien aufweist.
5. Arzneimittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Biomaterialien einem Verfahren zur Virusabreicherung und/oder Virusinaktivierung unterzogen sind.
6. Arzneimittel nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Biomaterialien in lyophilisiertem oder tiefgefrorenem Zustand vorliegen.
7. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Biomaterialien Gewebeklebstoff und/oder Kollagen vorgesehen sind.
8. Arzneimittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Gewebeklebstoff aus fibrinogenhaltigen Proteinen und Thrombin zusammengesetzt ist.
9. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich Epithelzellen und/oder Keratinozyten und/oder embryonale und/oder fetale Zellen und/oder Liposomen aufweist.

-15-

10. Verwendung von Thrombozyten oder Teilen von Thrombozyten, welche Wachstumsfaktoren enthalten und diese abgeben können, zur Herstellung eines Arzneimittels zur lokalen Anwendung für die Förderung der Wundheilung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 98/00278

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K35/14 A61K38/18 //(A61K38/18,35:14)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 34614 A (THERATECHNOLOGIES INC) 25 September 1997 see page 7, line 16-19; claims 1-8 ---	1-10
Y	DATABASE WPI Section Ch, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 73-31168U XP002092218 & SU 353 724 A (ARLOZOROV ZG) see abstract ---	1-10
Y	WO 91 17655 A (CRYOPHARM CORP) 28 November 1991 see page 4, line 33 - page 5, line 1; claims 1-4 --- -/--	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 1999

Date of mailing of the international search report

15/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Herrera, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 98/00278

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VALERI C R ET AL: "A SIMPLE METHOD FOR FREEZING HUMAN PLATELETS USING 6% DIMETHYLSULFOXIDE AND STORAGE AT - 80 C" BLOOD, vol. 43, no. 1, 1 January 1974, pages 131-136, XP000563674</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/AT 98/00278

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9734614 A	25-09-1997	US 5834418 A AU 2019597 A	10-11-1998 10-10-1997
WO 9117655 A	28-11-1991	US 5213814 A AT 149284 T AU 7888391 A CA 2064228 A DE 69124915 D EP 0483329 A JP 5500231 T	25-05-1993 15-03-1997 10-12-1991 18-11-1991 10-04-1997 06-05-1992 21-01-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00278

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K35/14 A61K38/18 //(A61K38/18,35:14)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 34614 A (THERATECHNOLOGIES INC) 25. September 1997 siehe Seite 7, Zeile 16-19; Ansprüche 1-8 ---	1-10
Y	DATABASE WPI Section Ch, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 73-31168U XP002092218 & SU 353 724 A (ARLOZOROV ZG) siehe Zusammenfassung ---	1-10
Y	WO 91 17655 A (CRYOPHARM CORP) 28. November 1991 siehe Seite 4, Zeile 33 - Seite 5, Zeile 1; Ansprüche 1-4 --- -/-	1-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und die Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Februar 1999

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

15/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrera, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00278

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>VALERI C R ET AL: "A SIMPLE METHOD FOR FREEZING HUMAN PLATELETS USING 6% DIMETHYLSULFOXIDE AND STORAGE AT - 80 C" BLOOD, Bd. 43, Nr. 1, 1. Januar 1974, Seiten 131-136, XP000563674</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00278

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9734614 A	25-09-1997	US 5834418 A	10-11-1998
		AU 2019597 A	10-10-1997
WO 9117655 A	28-11-1991	US 5213814 A	25-05-1993
		AT 149284 T	15-03-1997
		AU 7888391 A	10-12-1991
		CA 2064228 A	18-11-1991
		DE 69124915 D	10-04-1997
		EP 0483329 A	06-05-1992
		JP 5500231 T	21-01-1993